Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin
(Vorstand: Professor Dr. Zeiss)

Der fluorescenzmikroskopische Nachweis der Di-Bakterien

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des

Medizinischen Doktorgrades

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Gulam Farugk

aus Kabul (Afghanistan)

Tag der Promotion: 14. März 1940.

Druck: Karl u. Richard Hoffmann, Charlottenburg, Schillerstr. 44.

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Kreuz
Referent: Prof. Dr. Pesch
Korreferent: Prof. Dr. Zeiss

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Wir besitzen in der Bakteriologie bis jetzt noch keine exakte Methode, die es uns ermöglicht, auf Grund des schnellen Nachweises der Di-Bakterien sofort die mikroskopische Di-Diagnose zu stellen. Die Schwierigkeiten, die sich einer solchen Methode entgegenstellen, liegen in den Besonderheiten der Di-Bakterien selbst begründet. Da wir neben den Di-Bakterien auch Pseudo-Di-Bakterien kennen, die oft eine sehr ähnliche Form und auch Volutinkörnchen aufweisen, ist es oft schwierig oder gar unmöglich zu entscheiden, ob es sich um Di-Bakterien oder um Pseudo-Di-Bakterien oder andere diphthroide Stäbchen handelt. Die einzige Methode, die hier vielleicht eine schnelle Entscheidung herbeiführen könnte, wäre die Neisserfärbung. Aber auch sie ist nicht immer imstande, in solchen Fällen eine exakte Entscheidung herbeizuführen. Daher ist es verständlich, daß in der Bakteriologie diese Frage nur auf kulturellem Wege durch Spezialkulturen und Zuckervergärung entschieden werden kann. Daß alle diese Verfahren 24 Stunden und mehr Zeit erfordern, braucht nicht besonders betont zu werden. Diese Schwierigkeiten und der unvermeidbare Zeitverlust, der mit dem Kulturverfahren verbunden ist, machen die Notwendigkeit einer rein mikroskopischen Di-Diagnose verständlich. Um diesen Schwierigkeiten zu begegnen und eine Methode der mikroskopischen Di-Diagnose zu ermöglichen, wurde die Fluorescenzmikroskopie, die in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht hat, herangezogen. Die erste Arbeit über den Nachweis der Di-Bakterien mit dem Fluorescenzmikroskop stammt von Keller. Diese Untersuchungen Kellers bilden den Ausgangspunkt unserer vorliegenden Arbeit.

In seiner Veröffentlichung gibt Keller eine Färbung der Di-Bakterien mit dem Fluorochrom Coriphosphin H. an. Die Färbung wird sowohl für Di-Reinkulturen, Mischkulturen, Ps. Di-Kulturen als auch für direkte Rachenab-

striche angegeben. Die Technik der Färbung ist nach Keller folgende:

1. Fixierung des Präparates in Methanol 15—30 Sekunden.
2. Kurzes Abspülen im Wassertrog.
3. Färben 10 Minuten in essigsaurer Coriphosphinlösung, bestehend aus:

wässeriger Coriphosphin H-Stammlösung (0,1 %)	2 ccm
Eisessig	5 ccm
Aqua dest. ad	50 ccm

4. Abspülen im Wassertrog und trocknen.

Die mit dieser Färbung behandelten Präparate zeigen nach Keller eine ziegelrote Färbung der Volutinkörnchen, während sich die Di-Bakterienleiber dunkelgrün färben. Bei schwach positiven Präparaten empfiehlt Keller eine Vorfärbung von 5 Minuten in wässeriger Coriphosphin H-Stammlösung.

Wir haben in unserem Institut am Anfang eine lange Reihe von positiven Clauberg II- und III-Platten mit der Kellerschen Färbung untersucht. Die Resultate waren alle unbefriedigend. Da in der Kellerschen Arbeit die Claubergplatten nicht erwähnt waren, schrieben wir Professor Keller von dem negativen Ergebnis unserer Untersuchungen. In seiner Antwort betonte Keller, daß seine Färbung bei den tellurhaltigen Claubergplatten nicht anwendbar sei. In Bezug auf die Löfflerplatten schrieb er uns, daß die Di-Stämme erst auf mehrere Löfflerplatten gehen müßten, ehe sie mit der von ihm angegebenen Färbung nachweisbar werden.

Da die Ausführungen Kellers eine Einschränkung in der Anwendbarkeit seiner Färbung bedeuteten, gingen wir in unseren weiteren Versuchen dazu über, diese Mängel wenn möglich zu beseitigen. Zu diesem Zweck haben wir eine große Reihe von Di-Reinkulturen und Mischkulturen, die auf Clauberg II und III-Platten, beziehungsweise auf Löfflerplatten gezüchtet waren, unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Wir haben unsere Präparate mit verschiedenen chemischen Lösungen vor- und nachbehandelt. Nach langem Suchen fanden wir in der 0,1 %igen Permanganatlösung ein Mittel, welches uns möglich machte,

sowohl bei den Löfflerplatten als auch bei den Clauberg II- und III-Platten gute Resultate zu erzielen.

Die elektive Volutinkörnchendarstellung.

Bei unseren Versuchen stellten wir fest, daß die ziegelrote Färbung der Volutinkörnchen beträchtlich erhöht wird, wenn man die Präparate nach der Fixierung mit der 0,1%igen Kaliumpermanganatlösung vorbehandelt und dann erst nach Kellers Angaben färbt. Die Konzentration und die Zusammensetzung der Farblösungen, die wir bei unseren Versuchen anwandten, entsprechen den Angaben Kellers. Nur die Färbungszeiten haben wir bei unserer Färbungsmethode geändert, weil wir hierdurch bessere Resultate erzielten. Was die Haltbarkeit der Farblösungen anbetrifft, so empfehlen wir möglichst frisch angesetzte Lösungen zu benutzen.. Die Technik der von uns angewandten Methode ist folgende:

1. Fixierung in gleichen Teilen 96 % Alkohol + Methanol 17 Sekunden,
2. Abspülen im Wassertrog,
3. Behandeln mit Kaliumpermanganat (1 : 1000) 2 Minuten,
4. Abspülen im Wassertrog,
5. Vorfärben mit der 0,1 %igen Coriphosphin H-Stammlösung, 3 Minuten,
6. Abspülen im Wassertrog,
7. Färben 15 Minuten mit der essigsauren Coriphosphin H-Lösung bestehend aus:

wässerige Coriphosphin H-Stammlösung (0,1 %ig)	2 ccm
Eisessig	5 ccm
Aqua dest. ad	50 ccm

8. Abspülen im Wassertrog.
9. Trocknen unter Fließpapier.

Die so behandelten Präparate haben wir unter folgenden Voraussetzungen im Fluorescenzmikroskop untersucht: Ocular 10 x, Objektiv: Apochromat 40, Filter: (H) hell.

Die Präparate zeigen im Fluorescenzmikroskop eine leuchtend rote Volutinkörnchenfärbung, während die Di-

Bakterienleiber und anderen Keime als dunkel-verschwommene, schwach dunkelgrünfluorescierende Gebilde erscheinen. Dreht man die Mikrometerschraube langsam hin und her, so sieht man, wie an einer bestimmten Stelle die Volutinkörnchen aus der dunklen Umgebung aufleuchten, um bei der nächsten Drehung wieder zu verschwinden.

Wie schon gesagt, sieht man die Volutinkörnchen mit dem hellen (H) Filter bedeutend besser als mit dem dunklen (D) Filter. Wie diese Wirkung des Permanganats auf die Volutinkörnchen zu erklären ist, wissen wir nicht. Jedenfalls scheint das Permanganat auf die Di-Bakterienleiber und die Volutinkörnchen verschieden einzuwirken. Bei den ersteren führt es zu einer teilweisen oder vollkommenen Löschung der Fluorescenz, während es auf die Volutinkörnchen fluorescenzfördernd wirkt. Ob die Anlagerung des Permanganats an die Volutinkörnchen ein chemischer oder physikalischer Vorgang ist, ist nicht zu entscheiden. Nur eines können wir mit Bestimmtheit sagen, daß durch die Anlagerung des Permanganats an die Volutinkörnchen deren Empfänglichkeit für die Aufnahme des Coriphosphin H bedeutend erhöht wird.

Wir haben mit unserer Permanganatmethode eine große Anzahl von Präparaten untersucht, die von positiven Clauberg II, Clauberg III und Löfflerplatten stammten. Wir haben bei diesen Versuchen als Kontrolle die Neisserfärbung und die Kellersche Färbung benutzt. Wir konnten immer wieder feststellen, daß bei zahlreichen Präparaten unsere Methode positive Resultate aufwies, während die Kellersche Färbung negativ ausfiel. Besonders bei den Clauberg II-Platten konnten wir recht gute Resultate erzielen, dagegen waren die Ergebnisse der Clauberg III-Platten so unbeständig, daß wir unsere Versuche mit diesen Platten als gescheitert bezeichnen müssen.. Andererseits waren die Ergebnisse unserer Untersuchungen von Löffler-Reinkulturen und Mischkulturen befriedigend. Zusammenfassend können wir sagen, daß mit der Permanganatmethode Di-Bakterien von Clauberg II und Löfflerplatten gut dargestellt werden können.

Was die Zuverlässigkeit der von uns angewandten Methode anbetrifft, so haben wir doch immer wieder ein-

zelne Versager feststellen müssen. Trotzdem wir bessere Resultate der Kellerschen Färbung gegenüber feststellen konnten, sind wir überzeugt, daß die von uns angewandte Methode auf keinen Fall an die Zuverlässigkeit der Neisserfärbung heranreicht. Die Ergebnisse einer Untersuchungsreihe, die wir mit unserer Methode, der Kellerschen Färbung und der Neisserfärbung behandelt haben, zeigt Tabelle I. Ein jeder der hier untersuchten Di-Stämme ist gleichzeitig auf Löffler- Clauberg II- und Clauberg III-Platten gezüchtet und nach 24 Stunden Brutschrankaufenthalt gefärbt worden.

Die Untersuchung von Zahnabstrichen.

Zur Klarstellung der Tatsache, ob mit der Coriphosphinfärbung ausschließlich die Di-Bakterien eine Rotfärbung der Körnchen aufweisen oder ob auch andere Mundkeime sich gegenüber dem Coriphosphin H wie Di-Bakterien verhalten, haben wir eine Reihe von Zahnabstrichen untersucht. Hierbei haben wir besonders auf die Leptothrix und Streptothrixfäden geachtet, da ja diese volutinkörnchenähnliche Gebilde enthalten. Bei der Untersuchung von Zahnabstrichen verschiedener Mitarbeiter unseres Instituts konnten wir feststellen, daß nirgends eine Rotfärbung irgendwelcher Körnchen zu beobachten war.

Die Untersuchung von Pseudo-Di-Bakterien.

Im Anschluß an die Untersuchung der Zahnabstriche haben wir 15 Ps. Di-Stämme mit unserer Permanganatmethode untersucht. Hierbei konnten wir feststellen, daß die meisten Stämme, die bei der Neisserfärbung Volutinkörnchen aufwiesen, auch mit unserer Methode die Körnchenfärbung zeigten. Von den 15 Stämmen zeigen 9 Stämme bei der Neisserfärbung mehr oder weniger starke Volutinkörnchenfärbung, während wir bei unserer Permanganatmethode nur bei 6 Stämmen Volutinkörnchenfärbung feststellen konnten. Alle übrigen Stämme zeigten kurze Stäbchen ohne Körnchen. Was die Unterscheidung zwischen Di-Bakterien und Ps. Di-Bakterien anbetrifft, konnten wir

feststellen, daß es oft schwierig ist, einen sicheren Unterschied zu erkennen. Bei manchen Präparaten kann man aus dem engen Beieinanderliegen der Volutinkörnchen, ihrer verhältnismäßigen Kleinheit der echten Di-Bakterien gegenüber, und ihrer meist mehr ins orange spielenden Körnchenfärbung erkennen, daß es sich um Pseudo-Di-Bakterien handelt. Wie gesagt, ist eine genaue Unterscheidung in vielen Fällen genau wie bei der Neisserfärbung unmöglich. In solchen Fällen ist der kulturelle Nachweis und die Feststellung der Zuckervergärung nicht zu umgehen.

Tabelle II zeigt die Untersuchungsergebnisse der 15 Ps. Di-Stämme. Neben unserer Permanganatmethode haben wir als Kontrolle die Gram- und Neisserfärbung ausgeführt.

Die Doppelfluorochromierung der Di-Bakterien.

Bei unseren Untersuchungen mit der Kellerschen Färbung stellten wir fest, daß bei den Präparaten, die aus Mischkulturen stammten, eine mannigfaltige Farbennuancierung durch das Coriphosphin H zu beobachten war. Es waren Farbenschattierungen von ziegelrot bis gelb, orangegelb, hellgrün und dunkelgrün zu sehen. Oft zeigten die Einzelcoccen und Doppelcoccen eine Rotfärbung, die zur Verwechslung mit echten Volutinkörnchen Veranlassung geben konnte. Bei diesen vielfachen Farbenunterschieden war es oft schwierig, bei schwach positiven Präparaten die Di-Bakterien mit ihren roten Volutinkörnchen zu finden. Da man bei der von uns angewandten Permanganatmethode sowohl die Di-Bakterien als auch die Begleitflora infolge der mehr oder weniger stark auftretenden Fluorescenzlöschung nicht in ihren Einzelheiten genau sehen kann, haben wir versucht, durch eine Doppelfluorochromierung diese Nachteile zu beseitigen. Wir haben versucht, ein Fluorochrom ausfindig zu machen, das bei der Nachbehandlung die Di-Bakterien und die Begleitflora gleichmäßig blau färbt, ohne dabei die Rotfärbung der Volutinkörnchen zu beeinträchtigen. Wir haben zu diesem Zweck eine Reihe von verschiedenen Fluorochromen untersucht und

fanden in dem Fluorochrom Brillantdianilgrün den Farbstoff, der unseren Anforderungen entsprach. Die Vorteile, die wir bei der Nachfärbung unserer Präparate mit Brillantdianilgrün feststellten, sind:

1. Die zahlreichen Farbschattierungen, die bei der Kellerschen Färbung auftreten und die die Auffindung und Erkennung der Di-Bakterien in Mischkulturen erschweren, werden beseitigt. Die Präparate zeigen eine gleichmäßige Blaufärbung, die es uns möglich macht, etwa vorhandene Di-Bakterien schneller und sicherer zu erkennen.
2. Durch die Nachfärbung mit Brillantdianilgrün erfolgt bei den Präparaten, die mit unserer Permanganatmethode behandelt sind und eine Fluorescenzlöschung aufweisen, eine gleichmäßige Blaufärbung der Di-Bakterienleiber und der Begleitflora. Dabei wird die Rotfärbung der Volutinkörnchen nicht beeinträchtigt.
3. Durch die Nachfärbung mit Brillantdianilgrün werden die Di-Bakterienleiber blau gefärbt; daher ist der Farbkontrast zwischen dem Rot der Volutinkörnchen und dem Blau der Bakterienleiber schöner und kontrastreicher als bei der Kellerschen Färbung, bei welcher die Bakterienleiber bekanntlich grün gefärbt sind.

Diese Vorzüge der Doppelfluorochromierung der Di-Bakterien mit Brillantdianilgrün konnten wir nach vielen Versuchen in der folgenden Färbungstechnik am besten verwerten:

1. Fixierung in einem Gemisch gleicher Teile 96 % Alkohol + Methanol 15 bis 17 Sekunden,
2. Abspülen im Wassertrog,
3. Behandeln mit Kaliumpermanganat (1 : 1000) 2 Minuten. Wir empfehlen die Präparate während der Permanganatbehandlung so lange mit der Bunsenbrennerflamme von oben her zu erwärmen, bis eine leichte Dampfbildung des Permanganats auftritt. Stärkere Erhitzung ist dagegen unvorteilhaft.
4. Abspülen im Wassertrog,
5. Vorfärben mit der 0,1 %igen wässerigen Coriphosphin H-Stammlösung 3 Minuten,
6. Abspülen im Wassertrog,

7. Färben 15 Minuten mit der essigsauren Coriphosphin H-Lösung, bestehend aus:
   wässerigerCoriphosphin H-Stammlösg. (0,1 %) 2 ccm
   Eisessig 5 ccm
   Aqua dest. ad 50 ccm
8. Abspülen im Wassertrog.
9. Nachfärben mit der 0,1 %igen wässerigen Brillantdianilgrünlösung 15 Sekunden,
10. Abspülen im Wassertrog,
11. Trocknen unter Fließpapier.

Im Fluorescenzmikroskop wurden die Präparate mit Ocular 10 x, Objektiv Apochromat 40 und dem dunklen (D) Filter beobachtet. Die Präparate zeigen sowohl bei den Reinkulturen als auch bei den Mischkulturen eine einheitliche Blaufärbung. Die Di-Bakterien zeigen die ziegelrote Volutinkörnchenfärbung, während die Bakterienleiber eine blaue Fluorescenz aufweisen. Will man in diesen Präparaten die Volutinkörnchen besonders hervorheben, so schaltet man das helle (H) Filter ein. Jetzt sieht man die Volutinkörnchen stark aufleuchten, während die Di-Bakterienleiber und andere Bestandteile des Präparates dunkelverschwommen erscheinen.

Tabelle III zeigt die Färbungsergebnisse der Doppelfluorochromierungsmethode„ ausgeführt an Löffler-, Clauberg II- und Clauberg III-Platten. Als Kontrolle diente die Neisserfärbung.

Die Untersuchung von Rachenabstrichen mit einem Anreicherungsverfahren.

Mit der angegebenen Doppelfluorochromierungsmethode haben wir, nachdem wir unsere Versuche mit Reinkulturen und Mischkulturen abgeschlossen hatten, Rachenabstriche untersucht. Das hierzu ertwendige Di-Material haben wir uns jeden Tag von 3 verschiedenen Berliner Krankenhäusern besorgt. Die positiven Di-Tupfer haben wir auf zwei verschiedene Arten untersucht:

1. Der direkte Rachenabstrich: Wir haben mit dem Di-Tupfer direkt das Di-Material auf den Objektträger ausgestrichen und das Präparat, nachdem es trocken war, gefärbt.

2. Das Anreicherungsverfahren: Hierzu werden die Di-Tupfer in je ein Zentrifugenröhrchen, in die vorher 3 bis 4 ccm 0,85 % Kochsalzlösung gegeben waren, aufgeschwemmt.

Man schüttelt den Tupfer solange in der Kochsalzlösung, bis das ganze Material von der Watte des Tupfers in die Kochsalzlösung übergegangen ist. Nun wird das Material 10 Minuten lang zentrifugiert. Danach wird die Kochsalzlösung, die sich über den Bodensatz befindet, vorsichtig abgegossen und der Rand des Zentrifugenröhrchens schräg auf ein Stück Fließpapier gedrückt, damit die noch übriggebliebene Kochsalzlösung aufgesaugt wird.' Von dem Bodensatz wird nun mit einer ausgeglühten Oese 2 bis 3 Mal Material auf einen Objektträger gebracht. Man streicht das Material mit der Oese auf den Objektträger gleichmäßig aus und verhindert, daß das Präparat zu dick wird. Man kann auf diese Weise auf einen einzigen Objektträger das Material von 4 bis 6 Tupfern übertragen. Wir sind bei unseren Versuchen so vorgegangen, daß wir zuerst mit dem Di-Tupfer auf der einen Hälfte des Objektträgers den direkten Ausstrich anbrachten, danach den Tupfer aufschwemmten und zentrifugierten. Von dem Bodensatz haben wir dann auf die andere Hälfte des Objektträgers das angereicherte Material ausgestrichen. Auf diese Weise konnten wir beide Präparate auf einen Objektträger bringen, sie gleichzeitig färben und im Fluorescenzmikroskop untersuchen und miteinander vergleichen. Die so angefertigten Präparate werden so lange stehen gelassen, bis sie vollkommen trocken sind. Das Trocknen der Präparate über der Flamme ist nicht vorteilhaft.

Für die Färbung der Rachenabstriche haben wir die Konzentration der Coriphosphin H-Stammlösung erhöht, weil wir bei manchen Präparaten feststellten, daß die Rotfärbung der Volutinkörnchen zu schwach ausfiel. Auch die Dauer der Permanganatvorbehandlung haben wir abgekürzt, da wir bei manchen Präparaten beobachten konnten, daß sie bei längerer Vorbehandlung mit Permanganat zu dunkel wurden.

Die Technik der Färbung für die direkten Rachenabstriche und für das Anreicherungsverfahren ist somit folgende:

1. Fixierung in gleichen Teilen 96 % Alkohol – Methanol 15 bis 17 Sekunden,
2. Abspülen im Wassertrog.
3. Behandeln mit Permanganat (1 : 1000) 1 Minute.
4. Abspülen im Wassertrog,
5. Vorfärben in einer 0,15 %igen wässerigen Coriphosphin H-Stammlösung, 3 Minuten.
6. Abspülen im Wassertrog.
7. Färben 15 Minuten mit der essigsauren Coriphosphin H-Lösung bestehend aus:
   wässeriger Coriphosphin H-Stammlösg. (0,15%ig) 2 ccm
   Eisessig 5 ccm
   Aqua dest. ad 50 ccm
8. Abspülen im Wassertrog,
9. Nachfärben mit der 0,1 %igen Brillantdianilgrünlösung 15 Sekunden.
10. Abspülen im Wassertrog
11. Trocknen unter Fließpapier.

Wie oben gesagt, zeigen die so behandelten Präparate im Fluorescenzmikroskop eine gleichmäßige Blaufärbung. Weder die zahlreichen Epithelzellen noch die Begleitflora des Rachens zeigen die mannigfaltigen Farbenunterschiede, die wir bei der Kellerschen Färbung beobachteten. Wohl treten Unterschiede in der Farbhelligkeit der Bestandteile der Präparate auf, was darauf zurückzuführen ist, daß manche Elemente des Brillantdianilgrün intensiver aufnehmen, während andere sich damit nur schwach blau färben. Oft sieht man auch eine grünblaue Färbung der Präparate, die wahrscheinlich durch das Zusammenwirken des Brillantdianilgrüns und des Coriphosphins H hervorgerufen wird. Aber meist herrscht die allgemeine Blaufärbung bei den Präparaten vor. Zwischen den Epithelien und den anderen Keimen des Rachens sieht man dann die Di-Bakterien, die eine leuchtend rote Volutinkörnchenfärbung und eine Blaufärbung der Bakterienleiber zeigen, besonders deutlich. Bei den Präparaten des Anreicherungsverfahrens konnten wir oft beobachten, daß bei schwach positiven Abstrichen die Di-Bakterien besonders an den Rändern der Präparate zu finden sind.

Was die Vorteile des Anreicherungsverfahrens gegenüber dem direkten Abstrich angeht, konnten wir immer wieder feststellen, daß das Anreicherungsverfahren bessere Resultate aufwies. Da bei dem direkten Ausstrich der Ausfall der Präparate, besonders bei schwach positiven Fällen, von Zufälligkeiten bei der Anfertigung der Präparate abhängt, fallen diese Unregelmäßigkeiten bei dem Anreicherungsverfahren aus. Bei diesem haben wir es mit einem konzentrierten Material zu tun, das bei wirklich positiven Di-Fällen die Di-Bakterien in angereicherter Form enthält. Von dieser Tatsache konnten wir uns sowohl mit unserer Färbungsmethode als auch mit der Neisserfärbung überzeugen. Bei der Untersuchung der Rachenabstriche haben wir uns 4 verschiedener Kontrollen bedient. Wir haben mit jedem Tupfer, den wir untersuchten, zur Kontrolle je eine Clauberg II-, Clauberg III- und Löfflerplatte beimpft und die Platten nach 24 Stunden Brutschrankaufenthalt mit der Neisserfärbung untersucht.

Die Ergebnisse unserer Färbungsmethode und die der 4 verschiedenen Kontrollen zeigt die Tabelle IV.

Wie aus dieser Tabelle IV zu ersehen ist, sind die Resultate des Anreicherungsverfahrens denen der direkten Abstriche überlegen. In diesem Zusammenhang können wir feststellen, daß die fluorescenzmikroskopische Di-Diagnose mit unserer Doppelfluorochromierungsmethode besonders bei frischen Di-Fällen möglich ist. Dagegen versagt die Methode beim Nachweis der Di-Bakterien bei Rekonvalescenten und Bakterienträgern recht oft.

Die Doppelfluorochromierung mit nachfolgender Aufhellung durch Primulin.

Wir stellten bei vielen Präparaten, die wir mit der Doppelfluorochromierungsmethode behandelt hatten, fest, daß sie durch die vorausgehende Permanganatbehandlung zu dunkel ausfielen. Daher gingen wir daran, diesen Mangel durch eine nachträgliche Aufhellung zu beheben. Sowohl in der Kellerschen Arbeit als auch bei Haitinger wird das Fluorochrom Primulin als ein Aufhellungsmittel angegeben. Keller hat für die Aufhellung seiner Präparate

0,5 ccm 0,1 %iges Primulin der Coriphosphin-H-Lösung zugesetzt und damit die Präparate aufgehellt. Wir sind bei unseren Versuchen andere Wege gegangen. Wir haben eine lange Reihe von Di-Reinkulturen und Mischkulturen mit unserer Doppelfluorochromierungsmethode gefärbt und danach mit der 0,1 %igen Primulinlösung nachbehandelt. Wir stellten dabei fest, daß die 0,1 %ige Primulinlösung für unsere Präparate zu konzentriert war. Bei vielen Präparaten traten nämlich entweder eine Abblassung der Volutinkörnchen auf oder ihre Rotfärbung wurde vollkommen beseitigt. Deshalb haben wir die Konzentration der Primulinlösung auf 0,05 % herabgesetzt. Mit dieser Konzentration gelang es uns, die Präparate gut aufzuhellen, ohne daß dabei die Rotfärbung der Volutinkörnchen beeinträchtigt wurde. Die Aufhellung der Präparate führt man so aus, daß man sie nach der abgeschlossenen Doppelfluorochromierung 20 Sekunden mit der 0,05 %igen Primulinlösung behandelt, im Wassertrog abspült und danach unter Fließpapier abtrocknet. Wir konnten auf diese Weise sogar Präparate, die wir monatelang vorher gefärbt hatten, mit gutem Erfolge aufhellen. Man kann auch solche Präprate, die nach 20 Sekunden Aufhellung noch immer dunkel sind, weitere 5 bis 10 Sekunden nachbehandeln..

Was die Haltbarkeit der fluorochromierten Präparate anbetrifft, konnten wir nach monatelanger Aufbewahrung keine erheblichen Veränderungen feststellen.

Die Ergebnisse der Doppelfluorochromierungsmethode mit nachfolgender Aufhellung mit Primulin zeigt Tabelle V.

Zusammenfassung.

Wir haben aus den in dieser Arbeit angeführten Untersuchungen die Gewißheit bekommen, daß ein fluorescenzmikroskopischer Nachweis der Di-Bakterien möglich ist. Was die Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit der von uns angegebenen Methode für den fluorescenzmikroskopischen Nachweis der Di-Bakterien anbetrifft, so können wir zusammenfassend sagen, daß diese auf keinen Fall als exakte und absolut zuverlässige Methode betrachtet werden kann. Wie wir im Laufe dieser Arbeit schon oft betont haben, ist die Zahl der auftretenden Versager zu groß. Anderer-

seits konnten wir im Verlaufe unserer Untersuchungen die Zuverlässigkeit und Ueberlegenheit der Neisserfärbung, die wir immer als Kontrolle benutzten, gegenüber dem fluorescenzmikroskopischen Nachweis feststellen. Daher wird es weiteren Untersuchungen auf dem Gebiete der Fluorescenzmikroskopie vorbehalten bleiben, zu einer Methode zu gelangen, die uns eine sichere fluorescenzmikroskopische Di-Diagnose ermöglicht.

Tabelle I.

Nr.	Nährboden	Neisser	Keller	Permanganat-methode
24	Löffler	+++	++	++
24	Clauberg II	+++	—	++
24	Clauberg III	++	—	+—
33	Löffler	+++	++	+++
33	Clauberg II	+++	—	++
33	Clauberg III	++	—	+—
46	Löffler	+++	++	+++
46	Clauberg II	++	—	+
46	Clauberg III	++	—	—
20	Löffler	+++	+	++
20	Clauberg II	++	—	+
20	Clauberg III	++	—	—

Erläuterung: In den Tabellen I, II, III und V bedeuten:
+++ = sehr stark positiv, ++ = stark positiv,
+ = schwach positiv und +— = zweifelhaft.

Tabelle II.

Ps. Di. No.	Gramfärbung	Neisserfärbung	Permanganat-methode
1	plumpe Stäbchen	Körnchen —	Körnchen —
2	plumpe Stäbchen	Körnchen —	Körnchen —
3	plumpe Stäbchen	Körnchen —	Körnchen —
4	lange Stäbchen	Körnchen +	Körnchen ++
5	lange Stäbchen	Körnchen +	Körnchen +-+
6	plumpe Stäbchen	Körnchen +-	Körnchen +—
7	kurze Stäbchen	Körnchen +	Körnchen ++
8	plumpe Stäbchen	Körnchen ——	Körnchen —
9	kurze Stäbchen	Körnchen —	Körnchen —
10	lange Stäbchen	Körnchen —	Körnchen —
11	lange Stäbchen	Körnchen +—	Körnchen —
12	plumpe Stäbchen	Körnchen +—	Körnchen +—
13	kurze Stäbchen	Körnchen —	Körnchen —
14	lange Stäbchen	Körnchen +	Körnchen +—
15	plumpe Stäbchen	Körnchen +	Körnchen +-

Tabelle III.

No.	Nährboden	Neisserfärbung	Doppelfluoro-chromierung
791	Löffler	— + —	+ + +
791	Clauberg II	— + —	— +
791	Clauberg III	+ + +	—
24	Löffler	— + —	— + + +
24	Clauberg II	— + +	+ +
24	Clauberg III	— + +	—
699	Löffler	— + +	+
699	Clauberg II	— + +	—
699	Clauberg III	+ +	—
20	Löffler	— — +	— + +
20	Clauberg II	— + —	—
20	Clauberg III	— +	—
330	Löffler	— + +	— +
330	Clauberg II	— + +	—
330	Clauberg III	— +	—

Tabelle IV.

Nr.	direkter Rachenabstrich		Anreicherungsverfahren		Kontrollplatten		
	Neisser	Coriph.	Neisser	Coriph.	Löffler	Claub. II	Claub. III
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	—	+	+
3	+	+—	+—	+	+	+	+
4	+	+—	+—	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+—	+—	+	+	+	+	steril
8	+—	+—	+	+	+	+	steril
9	—	+—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—
11	+—	—		+—	—	—	—
12	+—	+	+	+	+	+	—
13	+	+	+	+	—	+	steril
14	+	+	+	+	+	+	steril
15	—	+	+	+	+—	steril	steril
16	—	+—	+—	+—	+—	steril	steril
17	—	—	+—	—	—	steril	steril
18	—	—	+—	—	—	steril	steril
19	+—	—	—	+—	—	—	steril
20	—	—	—	—	—	—	—
21	—	—	—	+—	—	+	steril
22	—	+	+	+	+	+	+
23	—	—	—	+	—	+	+—
24	—	—	+	+	+	+	+—
25	+	+—	+	+	+	+	+—
26	—	—	+—	+	—	steril	—
27	+—	+—	+—	+—	—	steril	—
28	—	—	—	—	—	—	—
29	—	+—	+—	—	—	steril	steril
30	—	—	—	—	—	steril	steril

Tabelle V.

Nr.	Gramfärbung	Neisserfärbung	Doppelfluorochromierung — Primulin
1	lange Stäbchen	Körnchen + +	Körnchen + + +
2	kurze Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + + +
3	plumpe Stäbchen	Körnchen + —	Körnchen + —
4	schlanke Stäbchen	Körnchen + +	Körnchen + —
5	kurze Stäbchen	Körnchen —	Körnchen —
6	kurze Stäbchen	Körnchen + —	Körnchen + —
7	kurze Stäbchen	Körnchen —	Körnchen —
8	kurze Stäbchen	Körnchen +	Körnchen —
9	kurze Stäbchen	Körnchen + —	Körnchen —
10	kurze Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + +
11	kurze Stäbchen	Körnchen +	Körnchen —
12	kurze Stäbchen	Körnchen +	Körnchen —
13	kurze Stäbchen	Körnchen + +	Körnchen —
14	plumpe Stäbchen	Körnchen + +	Körnchen +
15	plumpe Stäbchen	Körnchen +	Körnchen —
16	plumpe Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + +
17	plumpe Stäbchen	Körnchen + —	Körnchen —
18	lange Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + —
19	lange Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + +
20	kurze Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen +
21	kurze Stäbchen	Körnchen + +	Körnchen —
22	kurze Stäbchen	Körnchen + +	Körnchen —
23	lange Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + + +
24	lange Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen —
25	lange Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + + +
26	lange Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + + +
27	lange Stäbchen	Körnchen + + +	Körnchen + +
28	plumpe Stäbchen	Körnchen + +	Körnchen —

Jetzt, wo ich meine Arbeit zur Promotion einreiche, ist es mir ein Bedürfnis, dem Vorstand des Hygienischen Instituts der Universität Berlin, Herrn Professor Dr. Zeiß meinen herzlichen Dank auszusprechen für die Erlaubnis, daß ich dort arbeiten durfte.

Zu ganz besonderer Dankbarkeit bin ich Herrn Professor Pesch für seine gütigen Anregungen und Unterweisungen verpflichtet.

Schrifttum.

Haitinger: Die Fluorescenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie.
Keller: Wiener Medizinische Wochenschrift 1939 Nr. 12.
Küster: Deutsche medizinische Wochenschrift 1939 Nr. 3.

Lebenslauf.

Ich, G u l a m F a r u g k, bin am 15. Mai 1909 in Kabul/Afghanistan geboren und habe in Kabul die Volksschule und 2 Jahre lang eine höhere Schule besucht.

Im Jahre 1922 kam ich mit einer größeren Gruppe Afghanischer Schüler nach Berlin zum Studium. Hier besuchte ich mehrere Oberrealschulen und machte im Jahre 1929 in einem Oberrealschulkursus für Afghanische Schüler das Abiturium. Im Oktober 1929 fuhr ich nach Afghanistan und kehrte im April 1930 nach Berlin zurück und besuchte seit dieser Zeit bis 1938 die Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin, wo ich am 15. Oktober 1938 das Staatsexamen ablegte.